

EP 0305967 (1)  
A61K47/48H6H2-

(12)

-1- \* -

A61K47/48H6H2

ichungsnummer: **0 305 967**  
**A3**

(13)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88114130.3

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: A61K 45/02 , A61K 39/395 ,  
A61K 47/00 , A61K 37/02 ,  
C07K 15/14 , C07K 15/26

(22) Anmeldetag: 30.08.88

(30) Priorität: 02.09.87 CH 3357/87

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
08.03.89 Patentblatt 89/10

(64) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(66) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 31.01.90 Patentblatt 90/05

(71) Anmelder: CIBA-GEIGY AG  
Klybeckstrasse 141  
CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: von Wussow, Peter, Dr.  
Dammstrasse 30  
D-3017 Pattensen(DE)

(74) Vertreter: Zumstein, Fritz, Dr. et al  
Bräuhäusstrasse 4  
D-8000 München 2(DE)

(84) Konjugate von Cytokinen mit Immunglobulinen.

(97) Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate bestehend aus einem Cytokin, beispielsweise Interferon alpha, und menschlichem Immunglobulin, gewünschtenfalls verknüpft über einen organischen Brückenbildner, Verfahren zur Herstellung solcher Konjugate, pharmazeutische Zubereitungen und die Verwendung dieser Konjugate zur Behandlung von viralen Infektionen und von Tumoren. Gegenüber dem freien Cytokin weisen die Konjugate eine längere Verweilzeit in Plasma und Gewebe auf und verbessern damit die therapeutische Wirkung.

EP 0 305 967 A3

EP 0305967 (1)  
A61K47/48H6H2-

-1- \* -

A61K47/48H6H2

Veröffentlichungsnummer: **0 305 967  
A2**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑪ Anmeldenummer: 88114130.3

⑪ Int. Cl.: A61K 45/02 , A61K 39/395 ,  
A61K 47/00 , A61K 37/02 ,  
C07K 15/14 , C07K 15/26

⑫ Anmeldetag: 30.08.88

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:  
ES + GR.

⑪ Anmelder: CIBA-GEIGY AG  
Klybeckstrasse 141  
CH-4002 Basel(CH)

⑬ Priorität: 02.09.87 CH 3357/87

⑫ Erfinder: von Wussow, Peter, Dr.  
Dammstrasse 30  
D-3017 Pattensen(DE)

⑭ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
08.03.89 Patentblatt 89/10

⑬ Vertreter: Zumstein, Fritz, Dr. et al  
Bräuhäusstrasse 4  
D-8000 München 2(DE)

⑮ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑯ Konjugate von Cytokinen mit Immunglobulinen.

⑰ Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate bestehend aus einem Cytokin, beispielsweise Interferon alpha, und menschlichem Immunglobulin, gewünschtenfalls verknüpft über einen organischen Brückenbildner, Verfahren zur Herstellung solcher Konjugate, pharmazeutische Zubereitungen und die Verwendung dieser Konjugate zur Behandlung von viralen Infektionen und von Tumoren. Gegenüber dem freien Cytokin weisen die Konjugate eine längere Verweilzeit in Plasma und Gewebe auf und verbessern damit die therapeutische Wirkung.

EP 0 305 967 A2

## Konjugate von Cytokinen mit Immunglobulinen

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate bestehend aus einem Cytokin und menschlichem Immunglobulin, gewünschtenfalls verknüpft über einen organischen Brückenbildner, Verfahren zur Herstellung solcher Konjugate, pharmazeutische Zubereitungen und die Verwendung dieser Konjugate zur Behandlung von viralen Infektionen und von Tumoren.

5

Hintergrund der Erfindung

Cytokine sind lösliche Proteine und Glykoproteine, die durch somatische Zellen, insbesondere immun-  
 10 kompetente Zellen, als Antwort auf eine Stimulierung ausgeschieden werden. Cytokine weisen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten auf. Sie sind Botenmoleküle, die an der Regulation der Stoffwechsella-  
 ger Zellen beteiligt sind, in den Zellen lokal produziert werden und im Normalfall auch nur lokal wirksam sind. Die Cytokine verstärken oder unterdrücken dabei die Aktivität einer Nachbarzelle bezüglich einer  
 spezifischen Eigenschaft.

15 Beispiele für Cytokine sind Mediatoren, die Monozyten und Makrophagen beeinflussen, wie Makrophagen-Migrations-inhibierender Faktor (MIF), Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF) oder chemotaktischer Faktor für Makrophagen, Mediatoren, die polymorphkernige Leukozyten beeinflussen, wie  
 Leukozyten-inhibierender Faktor, Leukozyten-Migrations-inhibierender Faktor (LIF) oder Leukozyten-Migrations-verstärkender Faktor, Mediatoren die Lymphozyten beeinflussen, Antigen-spezifische oder un-  
 20 spezifische Helferzellfaktoren oder Antikörperproduktion-supprimierende Faktoren, Mediatoren, die auf andere Zellen wirken, wie Lymphotoxine, Tumor-Necrosis-Faktor (TNF), Kolonie-stimulierender Faktor (CSF),  
 Wachstums-inhibierende und Wachstums-verstärkende Faktoren, insbesondere B-Zell-Wachstumsfaktor (BCGF), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF), von Blutplättchen abgeleiteter (platelet-derived) Wach-  
 stumsfaktor (PDGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und andere, ferner die Gruppe der Interferone  
 25 (IFN) und die Gruppe der Interleukine (IL).

Interferone haben wie die meisten Cytokine ein Molekulargewicht im Bereich von 10'000 bis 40'000 Dalton. Sie schützen Zellen gegen eine Vielzahl von Viren, inhibieren das Zellwachstum in Kultur, beeinflussen die Immunantworten und erhöhen die Menge oder Aktivität gewisser spezifischer intrazellulärer Enzyme. Interferone werden in drei Klassen unterteilt, nämlich Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Natürliches  
 30 menschliches Interferon alpha (huIFN $\alpha$ ) wird durch Leukozyten und lymphoblastoide Zellen hergestellt und umfasst mindestens ein Dutzend verschiedener Polypeptide, die sich in der Aminosäurezusammensetzung und im Grad der Glykosylierung unterscheiden. Natürliches menschliches Interferon beta (huIFN $\beta$ ) wird von  
 nahezu allen Körperzellen, beispielsweise von Fibroblasten und in geringem Masse auch lymphoblastoiden Zellen, gebildet. Natürliches menschliches Interferon gamma (huIFN $\gamma$ ), das auch Immun-Interferon genannt  
 35 wird, wird durch T-Lymphozyten oder NK-Zellen hergestellt. Im Gegensatz zu IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  ist IFN $\gamma$  säurelabil (pH 2) und unterscheidet sich deutlich in seinen serologischen Eigenschaften.

Menschliche Cytokine für therapeutische Anwendungen können durch Kultur stimulierter normaler menschlicher Zellen erhalten werden. Diese Quelle ist aber wegen der beschränkten Zugänglichkeit zu kultivierbaren menschlichen Zellen, der inhärenten Trennprobleme und der Kosten von geringer praktischer  
 40 Bedeutung. Gewisse Cytokine können auch durch Kultur von kontinuierlichen menschlichen Zelllinien gewonnen werden. Die am besten geeignete Methode zur industriellen Herstellung der Cytokine ist jedoch die Kultivierung von gentechnologisch veränderten Bakterien, Pilzen oder Säugetierzelllinien, denen die genetischen Informationen zur Synthese des gewünschten Cytokins durch rekombinante Gentechnik eingebaut worden ist. Diese Methode ermöglicht auch die Herstellung von Verbindungen, die sich von natürlichen  
 45 Verbindungen unterscheiden und dadurch andere, bessere Eigenschaften für bestimmte Verwendungszwecke aufweisen.

Die therapeutische Anwendung von Cytokinen, beispielsweise von Interleukin 2, Interferon  $\alpha$  oder Interferon  $\gamma$ , ist nicht ohne Probleme. Sie werden normalerweise schnell abgebaut und/oder ausgeschieden. Bei einer systemischen Verabreichung ist es schwierig, die für eine antivirale oder anti-Tumor-Wirkung  
 50 notwendige hohe Plasma-Konzentration aufzubauen und zu erhalten. Auf der anderen Seite entstehen unerwünschte Nebenwirkungen, die möglicherweise auf den Durchtritt der Cytokine durch die Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen sind. Es besteht deshalb ein ausgesprochenes Bedürfnis für Wege und Mittel, um einerseits therapeutisch wirksame hohe Cytokin-Konzentrationen im Plasma zu erreichen, andererseits unerwünschte Nebenwirkungen in Grenzen zu halten oder zu verringern.

Gegenstand der Erfindung

Es ist Ziel der vorliegenden Erfindung, Cytokine in einer Form zur Verfügung zu stellen, die die Verlängerung der Aufenthaltsdauer und die Erhöhung der Konzentration der Cytokine in Blutplasma und Geweben ermöglicht. Als besonders geeignet für die Lösung dieser Aufgabe erweisen sich Konjugate aus einem Cytokin und menschlichem Immunglobulin, gewünschtenfalls verknüpft über einen organischen Brückenbildner, die überraschenderweise deutlich längere biologische Halbwertszeiten aufweisen als freie Cytokine. Ferner werden ein Verfahren zur Herstellung der Konjugate, pharmazeutische Zubereitungen und ihre Verwendung zur Behandlung von viralen Infektionen, und von Tumoren beschrieben.

10

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft Konjugate von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin.

Ein Cytokin ist ein lösliches Protein oder Glykoprotein, wie es von somatischen Zellen, beispielsweise von immunkompetenten Zellen, als Antwort auf eine Stimulierung synthetisiert und allenfalls ausgeschieden wird, um eine Stoffwechselumstellung benachbarter Zellen zu bewirken, beispielsweise um deren Wachstumseigenschaften zu beeinflussen, ferner eine verwandte Verbindung, die sich von einem natürlichen Cytokin durch Austausch, durch Fehlen oder durch Zusatz einer oder mehrerer Aminosäuren und/oder Kohlenhydratreste unterscheiden, oder ein Fragment einer solchen Verbindung, das die biologische Aktivität beibehält. Beispielsweise können eine, zwei, drei oder vier Aminosäuren des natürlichen Peptids durch andere Aminosäuren ausgetauscht sein oder ganz fehlen, eine, zwei, drei oder vier Aminosäuren zusätzlich vorhanden sein, z.B. am Aminoende des Peptids, einer oder zwei Kohlenhydratreste des natürlichen Glykoproteins durch andere Kohlenhydratreste ausgetauscht sein oder einer, zwei, drei oder alle Kohlenhydratreste fehlen. Ferner können verwandte Verbindungen beispielsweise auch aus Teilen zweier verschiedener Cytokine zusammengesetzt sein.

Beispiele für Cytokine nach dieser Definition sind die natürlich vorkommenden Faktoren, wie Makrophagen-Migrations-inhibierender Faktor (MIF), Makrophagen-aktivierender Faktor (MAF), Interleukin 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, Kolonie-stimulierender Faktor (CSF), Lymphotoxin, B-Zellen-Wachstumsfaktor (BCGF), Interferon alpha (IFN $\alpha$ ), Interferon beta (IFN $\beta$ ) oder Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), insbesondere die entsprechenden menschlichen Cytokine, ferner rekombinante Gentechnik in Prokaryonten, in Eukaryonten oder Säugertierzellen hergestellte, mit den natürlichen Faktoren identische oder verwandte Verbindungen, wie rekombinantes MAF, MIF, Interleukin, CSF, BCGF, Lymphotoxin, IFN $\alpha$ , z.B. IFN $\alpha_1$ , IFN $\alpha_2$ , IFN $\alpha_3$  etc. bis IFN $\alpha_{16}$  beziehungsweise IFN $\alpha/A$ , IFN $\alpha/B$ , IFN $\alpha/D$ , IFN $\alpha/F$  oder IFN $\alpha/B-D$ -Hybride, IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$ , ferner Fragmente der natürlichen oder rekombinanten Verbindungen, die die biologische Aktivität beibehalten. Nicht unter die Definition der Cytokine fallen Hormone und Antikörper (auch Immunglobuline genannt), die nach Stimulierung mit Antigenen und/oder Mitogenen durch B-Lymphozyten ausgeschieden werden.

Ein Immunglobulin ist ein humanes Immunglobulin (Antikörper), das zur Klasse der Immunglobuline A, D, E, G oder M, bevorzugt Immunglobulin G oder M, gehört. Dabei weist der variable Teil des Immunglobulins eine beliebige Spezifität auf. Vorzugsweise ist das Immunglobulin im Konjugat der Erfindung ein Gemisch von Antikörpern der gleichen Immunglobulin-Klasse, aber verschiedener, möglichst vielfältiger Spezifität, wie es aus Blut von gesunden Menschen gewonnen werden kann. Ein Immunglobulin im Konjugat der Erfindung kann aber auch ein polyklonaler oder monoklonaler menschlicher Antikörper spezifisch auf ein körperfremdes Antigen sein.

Ein Konjugat ist ein Hybridmolekül, in dem ein oder mehrere Cytokine und ein oder mehrere Immunglobuline kombiniert sind. Es handelt sich um einen chemischen Komplex, in dem die Kopplung über eine chemische Bindung, etwa über eine ionische oder kovalente Bindung oder gegebenenfalls über einen Brückenbildner, beispielsweise einen organischen Brückenbildner, erfolgt, oder um ein Assoziat der beteiligten Moleküle. Die genannten chemischen Komplexe oder Assoziat sind vorzugsweise unter physiologischen Bedingungen stabil.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise Konjugate der Formel

Ck-Z-Ig . (I),

worin Ck den Rest eines natürlichen humanen oder eines rekombinanten Cytokins, Ig den Rest eines menschlichen Immunglobulins und Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen organischen Brückenbildner darstellen und worin Ck, I und/oder Z auch mehrfach vorkommen können.

Der Rest Ck ist ein- oder mehrwertig, z.B. zwei- oder dreiwertig, abhängig von der Anzahl der

Wasserstoffatome und/oder Hydroxygruppen, die durch Bindungen zu Brückenbildnern Z oder Immunglobulin-Resten Ig ersetzt sind.

Der Rest Ig ist ein- oder mehrwertig, z.B. zwei-, drei-, vier-, fünf- oder sechswertig, abhängig von der Anzahl der Wasserstoffatome und/oder Hydroxygruppen, die durch Bindungen zu Brückenbildnern Z oder Cytokin-Resten Ck ersetzt sind.

In Konjugaten der Formel I, worin Z eine kovalente Bindung ist, können Cytokine und Immunglobuline durch eine Amidbindung zwischen einer endständigen Aminofunktion oder einer Seitenketten-Aminofunktion des einen Peptids und einer endständigen Carbonsäurefunktion oder einer Seitenketten-Carbonsäurefunktion des andern Peptids, oder durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung zwischen einer endständigen Aminofunktion oder einer Seitenketten-Aminofunktion des einen Peptids und einem Kohlenhydratrest des andern Glykoproteins verbunden sein.

In solchen Konjugaten, worin Z eine kovalente Bindung ist, sind die Reste des Cytokins und des Immunglobulins vorzugsweise durch eine Amidbindung zwischen der endständigen Carboxyfunktion des Cytokins und einer Aminofunktion des Immunglobulins oder durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung zwischen einer Aminofunktion des Cytokins und einem Kohlenhydratrest des Immunglobulins verbunden.

Ein organischer Brückenbildner Z ist ein mehrwertiger, z.B. 2-, 3- oder 4-wertiger Kohlenwasserstoffrest, welcher gewünschtenfalls substituiert ist und/oder worin eines oder mehrere Kohlenstoffatome gewünschtenfalls durch Heteroatome ersetzt sind, und welcher durch eine Amid-, Ester-, Amin-, Thioether-, Thioester- oder Disulfid-Einfachbindung oder durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung kovalent an das Cytokin und den Immunglobulinrest gebunden ist. Solche Kohlenwasserstoffreste haben bis zu 30, insbesondere 4-20 Kohlenstoffatome, und sind z.B. aliphatischer, cycloaliphatischer, aromatischer, araliphatischer oder aliphatisch-cycloaliphatischer Natur. Substituenten solcher Kohlenwasserstoffreste Z sind beispielsweise eine oder mehrere, z.B. zwei, gewünschtenfalls geschützte Hydroxygruppen, Oxo-, gewünschtenfalls geschützte Amino-, Imino-, Nitro-, Niederalkoxy-, Niederalkylamino-, Diniederalkylamino-, Niederalkyl-, gewünschtenfalls geschützte Hydroxyniederalkyl-, gewünschtenfalls geschützte Aminoniederalkyl-, gewünschtenfalls geschützte Mercaptoniederalkyl-, Methylthioniederalkyl-, gewünschtenfalls geschützte Carboxyniederalkyl-, Carbamoylniederalkyl-, Amidinoniederalkyl-, Arylniederalkyl-, z.B. Phenylniederalkyl- oder gewünschtenfalls geschützte Hydroxyphenylniederalkyl-, und Heteroarylniederalkyl-, z.B. gewünschtenfalls geschützte Indolylniederalkyl- oder Imidazolylniederalkyl-Gruppen. In solchen Kohlenwasserstoffresten Z sind Heteroatome, die Kohlenstoffatome ersetzen, beispielsweise Sauerstoff, Schwefel und/oder Stickstoff, wobei die Stickstoffatome gewünschtenfalls durch Niederalkyl substituiert sind oder Teil eines cycloaliphatischen Ring darstellen.

Zweiwertige Kohlenwasserstoffradikale sind beispielsweise Niederalkylen, Cycloalkylen, Phenylen oder Kombinationen dieser Reste, wie Niederalkylen-cycloalkylen, Niederalkylen-phenylen, Niederalkylen-cycloalkylen-niederalkylen, Niederalkylen-phenylen-niederalkylen oder ähnliches. Zweiwertige Kohlenwasserstoffradikale, worin Heteroatome Kohlenstoffatome ersetzen, sind beispielsweise Amino-niederalkylen, Niederalkylen-amino-niederalkylen, Hydrazino-phenylen-amino, Oxy-niederalkylen, Niederalkylen-oxy-niederalkylen, Thio-niederalkylen, Niederalkylen-thio-niederalkylen, Niederalkylen-dithio-niederalkylen und Azacycloalkylen, worin ein Stickstoff ein Ring-Kohlenstoffatom ersetzt, und Kombinationen der genannten Reste, wie beispielsweise 2-10 sich wiederholende Einheiten von gleichen oder verschiedenen Amino-Niederalkylenresten, welche gewünschtenfalls mit Hydrazino-phenylen, Amino-niederalkylen-dithio-niederalkylen-amino, Niederalkylen-azacycloalkylen, Niederalkylen-azacycloalkylen-thio-niederalkylen, Niederalkylen-phenylen-azacycloalkylen, Niederalkylen-cycloalkylen-azacycloalkylen, Niederalkylen-oxy- oder amino-niederalkylen-azacycloalkylen, Azacycloalkylen-phenylen-azacycloalkylen, Niederalkylen-amino-phenylen-amino-niederalkylen, Niederalkylenoxy-niederalkylen-oxy-niederalkylen oder ähnlichem verbunden sind.

Dreiwertige Kohlenwasserstoffradikale sind beispielsweise Niederalkylenmethylen, Phenylen-niederalkylen und ähnliche Reste und die entsprechenden Reste, worin Stickstoffatome Kohlenstoffatome ersetzen, beispielsweise Amino-phenylen-hydrazinylen. Vierwertige Kohlenwasserstoffreste sind beispielsweise Niederalkandiylen, Cycloalkandiylen oder ähnliche Reste.

Der Ausdruck "Nieder" in Verbindung mit Niederalkyl, Niederalkoxy, Niederalkylen oder ähnlichem bezeichnet solche Gruppen mit 1-7, bevorzugt mit 1-4, Kohlenstoffatomen. Niederalkyl hat vorzugsweise bis 4 Kohlenstoffatome und ist beispielsweise Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl oder tert-Butyl. Niederalkoxy hat vorzugsweise bis zu 4 Kohlenstoffatome und ist beispielsweise Methoxy, Ethoxy, Propoxy oder Butoxy. Niederalkylen hat vorzugsweise bis zu 7 Kohlenstoffatome und ist beispielsweise Methyl, Ethylen, 1,3-Propylen, 1,4-Butylen oder 1,6-Hexylen.

Cycloalkylen hat vorzugsweise 3-8 Kohlenstoffatome und ist beispielsweise 1,2-Cyclopentylen, 1,3-Cyclopentylen, 1,4-Cyclohexylen oder 1,5-Cyclooctylen. Phenylen ist 1,2-, 1,3- oder 1,4-Phenylen. Azacycloalkylen ist beispielsweise 1-Aza-1,2-cyclopentylen, 1-Aza-1,3-cyclopentylen oder 1-Aza-1,3-cyclohexylen.

Schutzgruppen sind jene, welche üblicherweise in der Peptid-und/oder Kohlenhydrat-Chemie verwendet werden.

Eine geschützte Aminogruppe liegt beispielsweise in Form einer leicht spaltbaren Acylamino-, Arylmethylamino-, 2-Acyl-niederalkylenyl-1-amino-, Silylamino- oder in der Form einer Azido-Gruppe vor. Bevorzugte Aminoschutzgruppen sind Acylradikale von Kohlensäure-Halbestern, insbesondere tert-Butoxycarbonyl, gewünschtenfalls substituiertes Benzyloxycarbonyl, Diphenylmethoxycarbonyl, 2-Halo-niederalkoxycarbonyl, Trityl oder Formyl

Eine Hydroxygruppe ist beispielsweise in Form einer leicht spaltbaren Acyloxygruppe, insbesondere einer Oxycarbonyloxy-Gruppe, wie tert-Butoxycarbonyloxy, Benzyloxycarbonyloxy oder 2-Halo-niederalkoxycarbonyloxy, oder einer leicht spaltbaren Ethergruppe, insbesondere Arylmethyloxy, wie Trityloxy, 1-Oxyalkyloxy, wie 1-Ethoxyethoxy oder 2-Tetrahydropyranyloxy, und Silyloxy, wie tert-Butyldimethylsilyloxy geschützt.

Eine Carboxygruppe ist beispielsweise in Form einer leicht spaltbaren Estergruppe geschützt. Bevorzugte Carboxy-Schutzgruppen sind tert-Butoxy, gewünschtenfalls substituiertes Benzyloxy, Diphenylmethoxy, Allyloxy und 2-(Trimethylsilyl)ethyloxy.

Eine Mercaptogruppe ist beispielsweise in Form einer leicht spaltbaren Thioester-, Monothioacetal-, Thioether- oder Disulfidgruppe geschützt.

Ein Brückenbildner Z ist mit dem Cytokin- und dem Immunglobulin-Rest beispielsweise über eine Amidbindung zwischen der endständigen Aminofunktion oder einer Seitenketten-Aminofunktion des Cytokins oder Immunglobulins und einer Carboxyfunktion von Z, durch eine Amidbindung zwischen einer endständigen Carboxyfunktion oder einer Seitenketten-Carboxyfunktion des Cytokins oder Immunglobulins und einer Aminofunktion von Z, einer Stickstoff-Kohlenstoff-Einzel- oder Doppelbindung zwischen einer endständigen oder einer Seitenketten-Aminofunktion des Cytokins oder Immunglobulins und einem Kohlenstoffatom von Z, durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einzel- oder Doppelbindung zwischen einem Kohlenhydratrest des Immunglobulins und einer Amin- oder Hydrazin-Funktion von Z, durch eine Esterbindung zwischen einer Hydroxyfunktion einer Aminosäure oder eines Kohlenhydratrestes des Cytokins oder Immunglobulins und einem Kohlenstoffatom von Z, durch eine Thioether- oder Thioester-Bindung zwischen einer Mercaptofunktion eines Cysteinrestes des Cytokins oder Immunglobulins und einem Kohlenstoffatom von Z oder durch eine Disulfidbrücke zwischen einer Mercaptofunktion eines Cysteinrestes des Cytokins oder Immunglobulins und einer Mercaptofunktion von Z verknüpft.

Ein Brückenbildner Z ist beispielsweise 1-Oxoniederalkylen oder 1-Oxo-niederalkylen-amino, wie Carbonyl-propylen, Carbonyl-propylen-amino, Carbonyl-ethylen, Carbonyl-ethylen-amino, oder vorzugsweise Carbonyl-methylen. Vorzugsweise ist eine solche Gruppe Z an das Cytokin oder Immunglobulin an der Carbonylgruppe und am Aminrest durch eine Amidverbindung geknüpft und gegebenenfalls am Niederalkylen-Ende durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung gebunden.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist beispielsweise ein divalent oder trivalent Rest bestehend aus 1 bis ungefähr 10, vorzugsweise 1 bis 3, Carbonyl-methylen-amino-Gruppen und gewünschtenfalls einer Carbonyl-methylen-, einer Phenyl-hydrazino- oder einer Phenyl-hydrazinyliden-Gruppe. In solch einer Carbonyl-methylen-amino-Gruppe ist Methylen gewünschtenfalls durch Niederalkyl, Hydroxyniederalkyl, Aminoniederalkyl, Mercaptoniederalkyl, Methylthioniederalkyl, Carboxyniederalkyl, Carbamoylniederalkyl, Amidoniederalkyl, Phenylniederalkyl, Hydroxyphenylniederalkyl, Indolylniederalkyl oder Imidazolylniederalkyl substituiert, beispielsweise wie in den Resten der natürlich vorkommenden Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Lysin, Cystein, Methionin, Asparagin, Glutamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan oder Histidin. Methylen und Amino in einer Carbonyl-methylen-amino-Gruppe können auch durch Niederalkylen überbrückt sein, z.B. wie im Rest der natürlich vorkommenden Aminosäure Prolin. Die Carbonyl-methylen-amino-Gruppen sind untereinander und mit der Carbonyl-methylen-Gruppe durch Amidbindungen verknüpft. Vorzugsweise ist ein solcher Brückenbildner mit dem Cytokin oder Immunglobulin am Carbonyl-Ende und am Amino-Ende durch eine Amidbindung verknüpft und, falls zutreffend, am Methylen-Ende oder am Hydrazin-Ende durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung und am Hydrazinyliden-Ende durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung.

Beispiele für solche Brückenbildner sind die Tripeptid-Reste Glycin-Alanin-Arginin, Isoleucin-Alanin-Tyrosin, die Pentapeptid-Reste Leucin-Glycin-Alanin-Alanin-Arginin, Glycin-Glycin-Leucin-Alanin-Tyrosin, Alanin-Isoleucin-Alanin-Isoleucin-Lysin und Brückenbildner, in welchen diese Peptid-Reste am Stickstoffende an Carbonyl-methylen, 4-Phenyl-hydrazino oder 4-Phenyl-hydrazinyliden gebunden sind.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist ein zweiwertiger Rest Amino-niederalkylen-thio, vorzugsweise Amino-ethylen-thio, Oxoniederalkylen-thio, vorzugsweise Carbonyl-methylen-thio oder Carbonyl-ethylen-thio, Methylen-carbonyl-methylen-thio oder 1-Iminoniederalkylen-thio, vorzugsweise Carbonimidoyl-propylen-thio. In einem solchen Brückenbildner ist die Thiofunktion an einen Cystein-Rest des Cytokins oder Immunglobu-

lins über eine Disulfidbrücke gebunden.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist der zweiwertige Rest Amino-niederalkylen-dithio-niederalkylen-amino, vorzugsweise Amino-ethylen-dithioethylen-amino, oder Oxoniederalkylen-dithio-oxoniederalkylen, vorzugsweise Carbonyl-methylen-dithio-methylen-carbonyl, Carbonyl-ethylen-dithio-ethylen-carbonyl oder Carbonyl-propylen-dithio-propylen-carbonyl, Oxoniederalkylen-dithio-iminoniederalkylen, z.B. Carbonyl-methylen-, -ethylen- oder -propylen-dithio-propylen-carbonimidoyl, oder Iminoniederalkylen-dithio-iminoniederalkylen, z.B. Carbonimidoyl-propylen-dithio-propylen-carbonimidoyl oder Carbonimidoyl-butylen-dithio-butylen-carbonimidoyl. In solchen Brückenbildnern ist die Carbonylfunktion an das Cytokin oder das Immunglobulin vorzugsweise über Amidbindungen und die Carbonimidoylfunktion vorzugsweise über Thioiminoesterbindungen geknüpft.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist beispielsweise der zweiwertige Rest, der einerseits aus Oxoniederalkylen, wie Carbonyl-ethylen, aus Carbonyl-cycloalkylen, wie Carbonyl-1,4-cyclohexylen, aus Methylen-carbonyl-methylen, Methylen-carboxy-niederalkylen, wie Methylen-carboxy-methylen, aus Methylen-carboxamido-niederalkylen, wie Methylen-carboxamido-methylen, oder aus Carbonyl-phenylen, vorzugsweise Carbonyl-1,3-phenylen und andererseits aus 1-Succinimidyl-3, 1-Succinimidyl-3-thio-niederalkylen-amino, wie 1-Succinimidyl-3-thio-ethylen-amino, aus 1-Succinimidyl-3-thio-oxoniederalkylen, worin Niederalkylen beispielsweise Ethylen oder vorzugsweise Propylen ist, aus 1-Succinimidyl-3-thio-methylen-carbonyl-methylen oder aus 1-Succinimidyl-3-thio-iminoniederalkylen, worin Niederalkylen vorzugsweise Butylen darstellt, aufgebaut ist. Die beiden Gruppen des Brückenbildners sind untereinander über das Stickstoffatom von Succinimidyl-3 verknüpft. Ein 1-Succinimidyl-3-Rest eines Brückenbildners ist beispielsweise am Kohlenstoff 3 an eine Mercaptogruppe eines Cysteinrestes des Cytokins oder Immunglobulins gebunden. Besonders bevorzugt sind die Brückenbildner Carbonyl-1,3-phenylen-1-succinimidyl-3-thio-ethylen-carbonyl und Carbonyl-1,3-phenylen-1-succinimidyl-3-thio-propylen-carbonimidoyl, die an das Cytokin und das Immunglobulin durch Amidbindungen oder eine Thioiminoesterbindung geknüpft sind.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist beispielsweise ein zweiwertiger Niederalkylenrest, ein dreiwertiger Niederalkylen-methylen-Rest oder ein vierwertiger Niederalkylen-Rest, wobei diese Reste durch Niederalkyl substituiert sein können, beispielsweise 1,5-Pentylen, 3-Methyl-1,5-pentylen, 3,3-Dimethyl-1,5-pentylen, 1,6-Hexylen, 1,4-Butylen-methylen, 1,5-Pentdiyliden, 3-Methyl-1,5-pentdiyliden, oder 3,3-Dimethyl-1,5-pentdiyliden, vorzugsweise 1,5-Pentylen und 1,5-Pentdiyliden. Solch ein Brückenbildner ist vorzugsweise mit dem Cytokin und dem Immunglobulin durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung oder Doppelbindung verknüpft.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist beispielsweise ein zweiwertiger Niederalkylen-Rest mit 2-Hydroxy-Gruppen, beispielsweise 2,3-Dihydroxy-1,4-butylen oder vorzugsweise 2,4-Dihydroxy-1,5-pentylen, oder Niederalkylen-oxy-niederalkylen und Niederalkylen-oxy-niederalkylen mit 2 Hydroxy-Gruppen, beispielsweise (2-Hydroxy-1,3-propylen)-oxy-(2-hydroxy-1,3-propylen) oder (2-Hydroxy-1,3-propylen)-oxy-(1,4-butylen)-oxy-(2-hydroxy-1,3-propylen). Ein solcher Brückenbildner ist vorzugsweise an das Cytokin und Immunglobulin über eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung verknüpft.

Ein weiterer Brückenbildner Z ist beispielsweise ein zweiwertiger Carbonyl-amino-phenylen-amino-carbonyl-Rest, der gewünschtenfalls durch Niederalkyl-Gruppen substituiert ist, z.B. Carbonyl-amino-1,4-phenylen-amino-carbonyl oder Carbonyl-amino-1-methyl-2,4- oder 2,6-phenylen-amino-carbonyl, oder die entsprechenden Thiocarbonyl-Reste. Ein solcher Brückenbildner ist an eine Aminogruppe des Cytokins und des Immunglobulins durch eine Amidbindung geknüpft und stellt auf diese Weise ein Harnstoff- bzw. Thioharnstoff-Derivat dar.

Die erfindungsgemässen Konjugate weisen im Vergleich zu den Cytokinen allein überraschenderweise eine wesentlich höhere Halbwertszeit der Verweildauer in Blutplasma und Geweben auf. Diese Beobachtung kann beispielsweise gemacht werden, indem Cytokine allein, erfindungsgemässe Konjugate und Gemische von nicht-konjugierten Cytokinen und Immunglobulin Versuchstieren, z.B. Mäusen, Ratten oder Kaninchen, intravenös, subkutan oder intramuskulär injiziert, in verschiedenen Zeitabständen Blut- oder Gewebeproben entnommen werden und deren Gehalt an Cytokin bzw. Cytokin-Konjugaten bestimmt wird. Dabei zeigt sich, dass die Halbwertszeit der Verweildauer der erfindungsgemässen Konjugate im Vergleich zu Cytokinen allein oder in Cytokin-Immunglobulin-Mischungen um einen Faktor 5 oder mehr erhöht ist.

Die erfindungsgemässen Konjugate können deshalb wie die entsprechenden Cytokine allein zur Behandlung von viralen Infektionen und/oder von Tumoren verwendet werden. Gegenüber den Cytokinen selbst weisen die erfindungsgemässen Konjugate jedoch den Vorteil auf, dass sie wegen der längeren Verweilzeit im Organismus und insbesondere in der Blutbahn oder Gewebeteilen in deutlich geringeren Mengen eingesetzt werden können. Im weiteren ist zu erwarten, dass die erfindungsgemässen Konjugate bei direkter Applikation am Wirkungsort dort länger verweilen und damit weniger Nebenwirkungen, z.B. im Zentralnervensystem, hervorrufen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Konjugate der Formel I, worin

Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons, Interleukins, einer verwandten Verbindung oder eines Fragments, das die biologische Aktivität beibehält, darstellt, beispielsweise Interferon alpha, beta oder gamma, Interleukin 2 oder ein rekombinantes Protein oder Glykoprotein, in dem eine, zusätzlich eine, zwei, drei oder alle Kohlenhydratreste eines Interferons oder Interleukins fehlen, Teile zweier verschiedener Interferone oder Interleukine miteinander kombiniert sind oder nur biologisch aktive Teil des Interferons oder Interleukins vorhanden ist,

Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins darstellt, beispielsweise ein Immunglobulin G oder

M aus Blut eines gesunden Menschen,

Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen, zwei-, drei- oder vierwertigen Kohlenwasserstoffrest darstellt, welcher gewünschtenfalls substituiert ist und/oder worin gewünschtenfalls eines oder mehrere, z.B. zwei, drei oder vier, Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel- und/oder gegebenenfalls substituierte Stickstoffatome ersetzt sind, beispielsweise Niederalkyl-, Cycloalkyl-, Phenyl- und Kombinationen der drei genannten Reste untereinander und/oder mit Oxy, Thio und gegebenenfalls durch Niederalkyl substituiertem Amino, ferner mit Azacycloalkyl-, wobei die genannten Reste durch Hydroxy, Oxo, Amino, Imino, Niederalkoxy, Niederalkylamino, Diniederalkylamino, Niederalkyl-, Hydroxyniederalkyl-, Aminoniederalkyl-, Mercaptoniederalkyl-, Methylthioniederalkyl-, Carboxyniederalkyl-, Carbamoylniederalkyl-, Amidoniederalkyl-, Phenylniederalkyl-, Hydroxyphenylniederalkyl-, Indolyniederalkyl oder Imidazolyniederalkyl substituiert sein können, ferner Niederalkyl-methyliden, Phenyl-niederalkyliden, Amino-phenyl-hydrazinyliden, Niederkandyliden oder Cycloalkandyliden,

und worin Ck, Ig und/oder Z auch mehrfach, beispielsweise zwei- oder dreifach, vorkommen können.

Ganz besonders betrifft die Erfindung Konjugate der Formel I, worin

Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons oder einer verwandten Verbindung darstellt, beispielsweise natürliches Interferon alpha, natürliches Interferon gamma, rekombinantes Interferon alpha, z.B. IFN $\alpha_1$ , IFN $\alpha_2$ , IFN $\alpha_3$  bis IFN $\alpha_6$  beziehungsweise IFN $\alpha$ /A, IFN $\alpha$ /B, IFN $\alpha$ /D, IFN $\alpha$ /F oder IFN $\alpha$ /B-D-Hybrid in glykosylierter oder unglykosylierter Form und mit gewünschtenfalls ausgetauschten, fehlenden oder einer bis vier zusätzlichen Aminosäuren, oder rekombinantes Interferon gamma,

Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins darstellt, beispielsweise ein Immunglobulin G oder

M aus Blut eines gesunden Menschen, und

Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen zweiwertigen Kohlenwasserstoffrest darstellt, welcher gewünschtenfalls durch Oxo oder Imino substituiert ist und/oder worin eines oder mehrere, z.B. zwei, drei oder vier, Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel-, und/oder Stickstoffatome ersetzt sind, beispielsweise unsubstituiertes oder durch Oxo und/oder Imino substituiertes Niederalkyl- und Kombinationen dieses Restes mit Oxy, Thio, Amino, Phenyl- und/oder Azacycloalkyl-, beispielsweise 1-Oxoniederalkyl-, z.B. Carbonyl-propylen-, Carbonyl-ethylen- oder Carbonyl-methylen-, 1-Oxoniederalkyl-amin-, z.B. Carbonyl-propylen-amino oder Carbonyl-ethylen-amino, Amino-niederalkyl-thio, z.B. Amino-ethylen-thio, Oxoniederalkyl-thio, z.B. Carbonyl-methylen-thio, Carbonyl-ethylen-thio oder Methylen-carbonyl-methylen-thio, 1-Iminoniederalkyl-thio, z.B. Carbonimidoyl-propylen-thio, Amino-niederalkyl-dithio-niederalkyl-amino, z.B. Amino-ethylen-dithio-ethylen-amino, Oxoniederalkyl-dithio-oxoniederalkyl-, z.B. Carbonyl-methylen-dithio-methylen-carbonyl, Carbonyl-ethylen-dithio-ethylen-carbonyl oder Carbonyl-propylen-dithio-propylen-carbonyl, Oxoniederalkyl-dithio-iminoniederalkyl-, z.B. Carbonyl-ethylen-dithio-propylen-carbonimidoyl, Iminoniederalkyl-dithio-iminoniederalkyl-, z.B. Carbonimidoyl-propylen-dithio-propylen-carbonimidoyl, Carbonyl-phenyl-succinimidyl-, z.B. Carbonyl-1,3-phenyl-1-succinimidyl-3-, Carbonyl-phenyl-succinimidyl-thio-niederalkyl-amino, z.B. Carbonyl-1,3-phenyl-1-succinimidyl-3-thio-ethylen-amino, Carbonyl-phenyl-succinimidyl-thio-oxoniederalkyl-, z.B. Carbonyl-1,3-phenyl-1-succinimidyl-3-thio-ethylen-carbonyl, oder Carbonyl-phenyl-succinimidyl-thio-iminoniederalkyl-, z.B. Carbonyl-1,3-phenyl-1-succinimidyl-3-thio-propylen-carbonimidoyl.

In erster Linie betrifft die Erfindung Konjugate der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons alpha, z.B. IFN $\alpha_2$ , oder IFN $\alpha$ /B-D-Hybrid, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G, beispielsweise wie es aus Blut eines gesunden Menschen gewonnen werden kann, und Z einen kovalent gebundenen, durch Oxo und/oder Imino substituierten Niederalkyl-dithio-niederalkyl-Rest, beispielsweise Carbonyl-ethylen-dithio-ethylen-carbonyl, Carbonyl-ethylen-dithio-propylen-carbonimidoyl oder Carbonimidoyl-propylen-dithio-propylen-carbonimidoyl, darstellen.

Zuallererst betrifft die Erfindung die in den Beispielen genannten Konjugate.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin, dadurch gekennzeichnet, dass ein Cytokin mit menschlichem Immunglobulin und gewünschtenfalls einem Brückenbildner umgesetzt wird. Die Konjugation erfolgt nach an sich bekannten Methoden.



Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Verfahren zur Herstellung von Konjugaten der Formel

Ck-Z-Ig (I).

- 5 dadurch gekennzeichnet, dass 2 oder 3 reaktive Teile des Konjugats der Formel I so miteinander zur Reaktion gebracht werden, dass ein Konjugat mit kovalenten Bindungen gebildet wird, und das Konjugat isoliert wird.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung das genannte Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teil durch eine Amidbindung verknüpft  
10 sind, ein Teil enthaltend eine Aminogruppe mit den komplementären Teil enthaltend eine Carbonsäure-Gruppe oder mit einem reaktiven Derivat davon kondensiert wird, oder

b) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Disulfidbindung verknüpft sind, zwei komplementäre Teile, die beide eine Mercaptogruppe enthalten, mit einem milden Oxidationsreagens behandelt werden, oder

- c) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Disulfidbindung verknüpft sind, ein reaktives, substituierbares funktionelles Derivat der Mercaptogruppe eines Teils mit dem komplementären Teil enthaltend eine Mercaptogruppe substituiert wird, oder

- d) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Schwefel-Bindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Mercapto-Gruppe an den komplementären Teil enthaltend  
20 eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung oder enthaltend eine Epoxid-Funktion addiert oder eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung durch die Mercapto-Gruppe substituiert wird, oder

- e) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einzel- oder Doppelbindung verknüpft sind, eine Aldehyd-Gruppe eines Teiles mit dem komplementären Teil enthaltend eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe kondensiert wird, und gewünschtenfalls die  
25 erhältliche Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung zu einer Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung mit einem Reduktionsmittel reduziert wird, oder

- f) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe an den komplementären Teil enthaltend eine Epoxid-Funktion addiert oder eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung durch  
30 die Amino- oder Hydrazino-Gruppe substituiert wird.

Paare von Teilen, die zusammen gemäss Verfahren a) mit einer Amidbindung verknüpft werden können, sind beispielsweise ein Cytokin und ein Immunglobulin, die beide eine freie Carboxygruppe bzw. eine freie Aminogruppe enthalten, ein Cytokin und ein Immunglobulin substituiert durch einen oder mehrere Brückenbildner enthaltend eine freie Carboxy- und/oder Amino-Gruppe, ein Cytokin substituiert durch einen  
35 oder mehrere Brückenbildner enthaltend eine freie Carboxy- und/oder Amino-Gruppe und ein Immunglobulin, oder ein Cytokin und ein Immunglobulin, die beide einen Brückenbildnerteil enthaltend eine freie Carboxy-Gruppe beziehungsweise eine freie Aminogruppe tragen und diese beiden Teile zusammen einen Brückenbildner Z ergeben. Solche Paare von Teilen oder Mischungen von drei Teilen bestehend aus Cytokin, Immunglobulin und einem Brückenbildner enthaltend eine freie Carboxy- und eine freie Amino-  
40 Funktion werden mit einem Kondensationsmittel behandelt. Geeignete Kondensationsmittel sind jene, die üblicherweise in der Peptid-Chemie verwendet werden, z.B. Carbodiimide, z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, vorzugsweise wasserlösliche Carbodiimide wie N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid oder N-Ethyl-N'-morpholinopropyl-carbodiimid, oder Isocyanide, z.B. 2-(N-Morpholino-ethyl)-isocyanid, gewünschtenfalls in Gegenwart eines tertiären Amins, z.B. Triethylamin, N-Methylmorpholin oder 4-Dimethylaminopyridin, und einer aktivierten, esterbildenden Hydroxy-Verbindung, z.B. N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid oder 1-Hydroxybenzotriazol. Andere geeignete Kondensationsmittel sind beispielsweise 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin oder aktivierte Phosphate wie Diphenylphosphorazidat oder Diethylphosphorcyanidat, gewünschtenfalls in Gegenwart eines tertiären Amins. Die Kondensation wird in einem wässrigen Lösungsmittel, das gegebenenfalls einen organischen  
50 oder anorganischen Puffer und/oder ein mischbares organisches Verdünnungsmittel enthält, z.B. ein Niederalkanol, z.B. tert-Butanol, ein Niederalkandiol, z.B. Glykol, Dimethylformamid, Acetonitril oder ähnliches, bei Temperaturen zwischen ungefähr -20 °C und ungefähr +50 °C, vorzugsweise zwischen 5 °C und Raumtemperatur, durchgeführt.

Reaktive funktionelle Derivate von Teilen im Verfahren a) können in situ gebildet werden und sind  
55 beispielsweise reaktive Carbonsäure-Derivate, z.B. aktivierte Carbonsäureester, reaktive gemischte Anhydride, reaktive cyclische Amide, Isocyanate oder Isothiocyanate.

Aktivierte Ester von Carbonsäuren sind beispielsweise vom Vinyl ester-Typ, z.B. eigentliche Vinyl ester, Carbamoylvinylder oder 1-Niederalkylvinylder, Ester vom Amidin-Typ, z.B. N,N-disubstituierte Amidi-

noester, welche durch Behandlung der entsprechenden Säure mit einem geeigneten N,N'-disubstituierten Carbodiimid erhalten werden können, beispielsweise mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, oder auch N,N'-disubstituierte Amidinoester, geeignete Arylester, insbesondere durch elektronenanziehende Substituenten substituierte Phenylester, z.B. 4-Nitrophenyl-, 2,4,5-Trichlorphenyl-, Pentachlorphenyl- oder 4-Phenyldiazo-phenylester, Cyanmethylester, Thioester, insbesondere Nitrophenylthioester, oder vorzugsweise Amino- oder Amidoester, welche beispielsweise durch Behandlung der entsprechenden Säure mit einer N-Hydroxyamino- oder N-Hydroxyamido-Verbindung erhalten werden, beispielsweise mit N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxypiperidin, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid oder 1-Hydroxybenzotriazol.

10 Reaktive gemischte Anhydride von Säuren sind beispielsweise Anhydride mit anorganischen Säuren, beispielsweise Säurehalogenide, insbesondere Säurechloride, Anhydride mit Kohlensäureniederalkylhalbestern, Anhydride mit dihalogenierten, insbesondere dichlorierten Phosphorsäuren oder Phosphorsäure-Derivaten, Anhydride mit starken Carbonsäuren, z.B. mit Trifluoressigsäure, oder Anhydride mit organischen Sulfonsäuren, z.B. mit Niederalkansulfonsäuren oder Arylsulfonsäuren, wie Methan- oder p-Toluolsulfonsäure.

15 Geeignete cyclische Amide sind insbesondere solche mit fünfgliedrigen aromatischen Diazaheterocyclen, beispielsweise Amide mit Imidazol oder Pyrazol, z.B. mit 3,5-Dimethylpyrazol.

Reaktive Carbonsäurederivate werden mit einem Reaktionspartner enthaltend eine freie Aminogruppe unter den gleichen Reaktionsbedingungen, wie oben für nichtaktivierte Teile beschrieben, umgesetzt, mit dem Unterschied, dass das Kondensationsmittel weggelassen werden kann. Vorzugsweise wird eine säurebindende Verbindung zugesetzt, beispielsweise ein Alkalimetallcarbonat oder -bicarbonat, z.B. Natrium- oder Kaliumcarbonat oder Natrium- oder Kaliumbicarbonat, üblicherweise zusammen mit dem entsprechenden Sulfat, oder eine organische Base, z.B. ein sterisch gehindertes Triniederalkylamin, z.B. Ethyldiisopropylamin.

25 Vorzugsweise sind die reaktiven Carbonsäuren Derivate des Brückenbildners, beispielsweise Dicarbonsäuredichloride, aktivierte Dicarbonsäurediester, Diisocyanate, z.B. Phenylen-1,4-diisocyanat oder 1-Methylphenylen-2,4-diisocyanat, oder Diisothiocyanate.

Die Ausgangsmaterialien für das Verfahren a) sind bekannt oder können nach bekannten Verfahren hergestellt werden, beispielsweise durch ein Verfahren wie es oben oder im folgenden beschrieben ist.

30 Paare von Teilen, die gemäss Verfahren b) oder c) eine Disulfid-Bindung ergeben können, sind z.B. ein Cytokin und ein Immunglobulin, welche beide einen Brückenbildnerteil enthaltend eine Mercaptofunktion enthalten und worin die Brückenbildnerteile zusammen den Rest Z ergeben. Im Verfahren c) liegt die Mercapto-Gruppe eines der beiden Teile in Form eines reaktiven, substituierbaren funktionellen Derivates vor.

35 Geeignete Oxidationsmittel für das Verfahren b) der vorliegenden Erfindung sind insbesondere milde Oxidationsmittel, beispielsweise Jod, 1,2-Dijodethylen, o-Jodbenzoesäure, 1,10-Phenanthrolin und Kupfersulfat, Kaliumhexacyanoferrat(III) oder vorzugsweise Sauerstoff oder Luft. Die Reaktion wird in Wasser oder wässriger Pufferlösung bei einem pH zwischen ungefähr 3 und ungefähr 9, vorzugsweise nahe dem Neutralpunkt, durchgeführt, und zwar bei Temperaturen zwischen ungefähr -5°C und ungefähr Raumtemperatur. Das wässrige Reaktionsmedium enthält gewünschtenfalls ein mischbares organisches Lösungsmittel, beispielsweise einen Niederalkohol, z.B. tert-Butanol, Dimethylformamid, Acetonitril oder ähnliches, und/oder ein Alkalimetalljodid, beispielsweise Natrium- oder Kaliumjodid.

Ein reaktives, substituierbares funktionelles Derivat der Mercapto-Gruppe eines Teiles im Verfahren c) kann in situ gebildet werden und ist beispielsweise ein Sulfenylhalogenid, Sulfenamid, Sulfenylsulfon, 45 Thiosulfat oder vorzugsweise ein gemischtes Disulfid.

Ein Sulfenylhalogenid ist beispielsweise ein Sulfenylchlorid oder ein Sulfenylbromid. Ein Sulfenamid ist beispielsweise von einem cyclischen Amin, einem Dicarbonsäureimid oder einem Heterocyclus abgeleitet und ist z.B. N-Sulfenylpiperidin, N-Sulfenylsuccinimid, N-Sulfenylphthalimid, N-Sulfenyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureimid, 1-Sulfenylbenzotriazol oder 1-Sulfenylimidazol.

50 Ein gemischtes Disulfid ist beispielsweise ein Disulfid mit einem aromatischen Thiol, z.B. mit Thiophenol substituiert durch Halogen, Nitro, Cyano oder Carboxy, z.B. mit o-Chlorthiophenol, 2,4-Dichlorthiophenol oder p-Nitrothiophenol, oder ein Disulfid mit einem heteroaromatischen Thiol, z.B. mit Pyridinthiol, vorzugsweise mit 2-Pyridinthiol, mit Mercaptopyridincarbonsäure, Chinolinthiol, 2-Mercaptobenzimidazol, 2-Mercaptobenzthiazol oder mit 2-Mercaptobenzoxazol.

55 Ein Sulfenylsulfon ist beispielsweise ein Niederalkylthiosulfonat, z.B. ein Methanthiosulfonat, oder ein Benzolthiosulfonat, das gewünschtenfalls durch Methyl, Nitro oder Halogen substituiert ist; z.B. p-Toluolthiosulfonat.

In einem Thiosulfat ist der organische Rest enthaltend die derivatisierte Mercapto-Funktion an den

Schwefel gebunden. Vorzugsweise ist das Thiosulfat in anionischer Form, beispielsweise ein Alkalimetallthiosulfat, z.B. Natrium- oder Kaliumthiosulfat.

Besonders bevorzugt als reaktives, substituiertes funktionelles Derivat der Mercapto-Gruppe im Verfahren c) ist ein gemischtes Disulfid, insbesondere ein Disulfid mit 2-Pyridinethiol.

- 5 Die reaktiven funktionellen Derivate der Mercapto-Gruppe werden aus Verbindungen mit freier oder anderweitig derivatisierter Mercapto-Funktion nach den üblichen bekannten Methoden hergestellt.

In Verfahren c) werden der Reaktionspartner enthaltend eine freie Mercapto-Gruppe und der Reaktionspartner enthaltend ein reaktives, substituiertes funktionelles Derivat der Mercapto-Gruppe in Wasser oder vorzugsweise in wässrigem Puffer bei einem pH zwischen ungefähr 3 und ungefähr 9, vorzugsweise nahe dem Neutralpunkt, d.h. bei einem pH zwischen 6 und 8, bei Temperaturen zwischen ungefähr -20 °C und ungefähr +50 °C, vorzugsweise zwischen -5 °C und Raumtemperatur, umgesetzt. Gewünschtenfalls enthält das wässrige Reaktionsmedium ein mischbares organisches Lösungsmittel, beispielsweise ein Niederalkanol, z.B. tert-Butanol, Dimethylformamid, Acetonitril oder ähnliches.

- Die Ausgangsmaterialien für die Verfahren b) und c) sind bekannt oder können nach an sich bekannten 15 Verfahren hergestellt werden, beispielsweise durch ein Verfahren, wie es oben oder im folgenden beschrieben ist. Ein substituiertes Cytokin und ein substituiertes Immunglobulin, worin die Substituenten eine Mercapto-Gruppe tragen, werden beispielsweise aus dem Cytokin beziehungsweise dem Immunglobulin durch Reaktion mit einer Verbindung enthaltend eine geschützte Mercapto-Gruppe und eine aktivierte Carbonsäurefunktion, beispielsweise einen aktivierten Ester wie oben unter Verfahren a) beschrieben, 20 hergestellt. Die Schutzgruppe der Mercapto-Funktion wird dann durch an sich bekannte Verfahren abgespalten. Beispielsweise kann ein Disulfid, wie es oben als reaktives substituierbares funktionelles Derivat der Mercapto-Gruppe beschrieben ist, als Schutzgruppe während eines Verfahrens analog Verfahren a) verwendet werden und danach unter milden Reduktionsbedingungen gespalten werden, beispielsweise mit einem Thiol, z.B. 2-Mercaptoethanol, 3-Mercapto-1,2-propanediol, Thioglykolsäure, Thioglykolsäuremethylester oder 25 3-Mercaptopropionsäure, oder vorzugsweise mit einem Dithiol, z.B. Dithioerythritol oder Dithioerythritol, in wässriger Pufferlösung bei einem pH zwischen ungefähr 3 und ungefähr 6, vorzugsweise zwischen pH 4 und 5, bei Temperaturen zwischen ungefähr -5 °C und ungefähr Raumtemperatur.

Ein substituiertes Cytokin und ein substituiertes Immunglobulin, worin die Substituenten eine Mercapto-Funktion tragen, können beispielsweise auch aus einem Cytokin beziehungsweise einem Immunglobulin 30 durch Reaktion mit einem Iminothiolacton, beispielsweise mit 2-Iminothiolan, in wässriger Pufferlösung bei einem pH zwischen ungefähr 5 und ungefähr 9, vorzugsweise nahe dem Neutralpunkt, d.h. um pH 8, bei Temperaturen zwischen ungefähr -5 °C und ungefähr Raumtemperatur, hergestellt werden.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, worin ein Cytokin oder ein Immunglobulin mit N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat gemäß Verfahren a) kondensiert, gleichzeitig das entsprechend ergänzende 35 Immunglobulin oder Cytokin mit 2-Iminothiolan in der oben beschriebenen Art und Weise umgesetzt und die beiden Teile gemäß Verfahren c) zu einer Dithiobindung verknüpft werden. Vorzugsweise werden die Reaktionsschritte ohne Isolierung der Zwischenprodukte durchgeführt.

Paare von Teilen, die zusammen gemäß Verfahren d) eine Kohlenstoff-Schwefel-Bindung bilden können, sind beispielsweise durch Brückenbildneranteile substituierte Cytokine und Immunglobuline, worin ein 40 Brückenbildneranteil eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung, eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung oder eine Epoxid-Funktion und der andere Brückenbildneranteil eine Mercapto-Gruppe trägt und die beiden Brückenbildneranteile zusammen den Rest Z ergeben.

Die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung im Verfahren d) ist vorzugsweise an einem oder beiden Enden durch eine elektronenziehende Gruppe substituiert, z.B. durch eine Carbonylgruppe eines Ketons, 45 eines Esters oder eines Amids, z.B. wie in Vinylketonen, Acrylethern, Acrylamiden, substituierten 2-Buten-1,4-dionen, z.B. Chinonen, Fumarestern, Fumaramiden, Maleinestern oder vorzugsweise Maleimiden.

Das Halogenatom einer Kohlenstoff-Halogen-Bindung im Verfahren d) ist beispielsweise Chlor, Brom oder Jod. Die Kohlenstoff-Halogen-Bindung ist vorzugsweise durch eine Kohlenstoff-Kohlenstoff- oder eine Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung aktiviert, beispielsweise wie in Allylhalogeniden, Halomethylketonen, 50 z.B. Chloromethylketonen, Haloessigsäuren und Haloessigsäurederivaten, z.B. Jod-, Brom- oder Chloracetaten und -acetamiden,  $\alpha$ -Chlor-niederalkan-carboxylaten und dergleichen.

Die Epoxid-Funktion im Verfahren d) ist vorzugsweise eine primäre Epoxid-Funktion, d.h. ein monosubstituiertes Oxiran, und kann beispielsweise in situ aus einem Halohydrin durch Behandlung mit einer Base erhalten werden.

- 55 Im Verfahren d) werden die Reaktionspartner in einem wässrigen Lösungsmittel, das gewünschtenfalls einen organischen oder anorganischen Puffer und/oder ein mischbares organisches Lösungsmittel, z.B. ein Niederalkanol, ein Niederalkandiol, Dimethylformamid, Acetonitril oder ähnliches enthält, vorzugsweise in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, beispielsweise eines Alkalimetallcarbonats oder -bicarbonats, z.B.

Natrium- oder Kaliumcarbonat oder Natrium- oder Kaliumbicarbonat, oder eines Erdalkalimetallcarbonats, z.B. Magnesiumcarbonat oder Calciumcarbonat, oder einer organischen Base, z.B. eines sterisch gehinderten Triniederalkylamins, z.B. Ethyldiisopropylamin, bei Temperaturen zwischen ungefähr  $-20^{\circ}\text{C}$  und ungefähr  $+50^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise zwischen  $-5^{\circ}\text{C}$  und Raumtemperatur, umgesetzt.

- 5 Die Ausgangsmaterialien für das Verfahren d) sind bekannt oder können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden, beispielsweise nach einem wie oben oder im folgenden beschriebenen Verfahren. Insbesondere werden substituierte Cytokine oder substituierte Immunglobuline enthaltend Mercapto-Gruppen in der für die Ausgangsmaterialien für das Verfahren b) und c) beschriebenen Art und Weise hergestellt.

- 10 Paare von Teilen, die zusammen eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfach- oder -Doppelbindung gemäss Verfahren e) bilden können, sind beispielsweise ein Cytokin enthaltend eine freie Aminogruppe oder substituiert durch einen oder mehrere Brückenbildner enthaltend eine freie Amino- oder Hydrazin-Funktion und ein reaktives Derivat eines Immunglobulins enthaltend eine Aldehydfunktion, ein reaktives Derivat eines Cytokins enthaltend eine Aldehydfunktion und ein Immunglobulin enthaltend eine freie Aminogruppe oder  
15 einen Brückenbildner mit einer freien Amino- oder Hydrazin-Funktion, oder ein substituiertes Cytokin und ein substituiertes Immunglobulin, worin ein Substituent eine Aldehyd-Funktion und der andere, ergänzende Substituent eine Amino- oder Hydrazino-Funktion enthält und die beiden Substituenten zusammen einen Brückenbildner Z darstellen.

- Ein Konjugat der Formel I wird auch im Verfahren e) aus einer Mischung enthaltend ein Cytokin, ein  
20 Immunglobulin und ein reaktives Derivat des Brückenbildners enthaltend zwei Aldehyd-Funktionen gebildet, beispielsweise einen Niederalkan-dialdehyd, z.B. Glutaraldehyd.

- Die Kondensation gemäss Verfahren e) wird in einem wässrigen Lösungsmittel, das gewünschtenfalls einen organischen oder anorganischen Puffer und/oder ein mischbares organisches Lösungsmittel, z.B. ein Niederalkanol, z.B. tert-Butanol, ein Niederalkandiol, z.B. Glykol, Diethylenglykol, Polyethylenglykol, Dime-  
25 thylformamid, Acetonitril oder ähnliches enthält, bei Temperaturen zwischen ungefähr  $-20^{\circ}\text{C}$  und ungefähr  $+50^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise zwischen  $-5^{\circ}\text{C}$  und Raumtemperatur, durchgeführt.

- Die auf diese Weise erhältlichen Konjugate enthaltend Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindungen, d.h. Imine oder Hydrazone, werden, falls erwünscht, mit einem selektiven Reduktionsmittel behandelt, das die Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung zu der stabileren Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung reduziert, ohne  
30 die Amidbindungen der Proteine zu verändern. Solche Reduktionsmittel sind beispielsweise Borhydride, z.B. Alkalimetall-, z.B. Natrium- oder Kaliumborhydrid, oder Zinkborhydrid, worin gewünschtenfalls ein oder zwei Hydride durch Niederalkoxygruppen ersetzt sind, z.B. wie in Natrium-dimethoxyborhydrid oder Natrium-tert-butoxyborhydrid, oder vorzugsweise worin ein Hydrid durch eine Cyanogruppe ersetzt ist, wie in Natriumcyanoborhydrid.

- 35 Die Reduktion wird in wässrige Pufferlösung bei einem pH zwischen ungefähr 3 und ungefähr 9, vorzugsweise zwischen pH 3 und 6 für Reduktionen mit Natriumcyanoborhydrid und nahe dem Neutralpunkt, d.h. bei einem pH zwischen 6 und 8, für Reduktionen mit Metallborhydriden, die gegebenenfalls durch Niederalkoxygruppen substituiert sind, bei Temperaturen zwischen ungefähr  $-20^{\circ}\text{C}$  und ungefähr  $+50^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise zwischen  $-5^{\circ}\text{C}$  und Raumtemperatur, durchgeführt. Gewünschtenfalls enthält das wässrige  
40 Lösungsmittel ein mischbares organisches Verdünnungsmittel, beispielsweise ein Niederalkanol, z.B. Methanol, Ethanol, Isopropanol oder tert-Butanol, oder Diethylenglykol, Triethylenglykol, Acetonitril oder ähnliches.

- Die Ausgangsmaterialien für Verfahren e) sind bekannt oder können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden, beispielsweise durch ein oben oder im folgenden beschriebenes Verfahren. Reaktive  
45 Derivate eines Cytokins oder Immunglobulins enthaltend eine Aldehyd-Funktion können gemäss einem Verfahren hergestellt werden, wie es in der Europäischen Patentanmeldung 88 695 beschrieben ist. Dabei werden die Kohlenhydratreste der besagten Verbindungen durch teilweise Oxidation in Aldehyd-Derivate übergeführt. Diese Patentanmeldung beschreibt ebenfalls die Bildung von Verbindung mit einer Hydrazin-Funktion, z.B. durch Reaktion eines Amins mit p-Fluorphenylhydrazin.

- 50 Paare von Reaktionspartnern, die eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung gemäss Verfahren f) bilden können, sind beispielsweise ein Cytokin enthaltend eine freie Aminogruppe und ein Immunglobulin substituiert durch einen oder mehrere Brückenbildner enthaltend eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung oder eine Epoxid-Funktion, ein Cytokin substituiert durch einen oder mehrere Brückenbildner enthaltend eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung oder eine Epoxid-Funktion und ein Immunglobulin enthaltend eine freie  
55 Aminogruppe, oder substituierte Cytokine und substituierte Immunglobuline, worin ein Substituent eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe und der andere Substituent eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung oder eine Epoxid-Funktion enthält und die Substituenten paarweise zusammen einen Brückenbildner Z ergeben. Ein Konjugat der Formel I wird ebenfalls im Verfahren f) aus einer Mischung enthaltend ein Cytokin, ein

Immunglobulin und ein reaktives Derivate eines Brückenbildners enthaltend zwei Kohlenstoff-Halogen-Bindungen oder zwei Epoxid-Funktionen gebildet.

Die Art der Kohlenstoff-Halogen-Bindung und der Epoxid-Funktion ist vorzugsweise wie oben unter Verfahren d) beschrieben. Reaktive Derivate eines Brückenbildners enthaltend zwei Kohlenstoff-Halogen-Bindungen sind beispielsweise Bis-halomethylketone, z.B. 1,3-Dichlor- oder 1,3-Dibromaceton, Bis-haloesigsäurederivate, z.B. 1,4-Butandiyl-bis-jod- oder -brom-acetat und ähnliche Verbindungen. Reaktive Derivate eines Brückenbildners enthaltend zwei Epoxid-Funktionen sind z.B. Butadien-bis-epoxid, 1,4-Pentadien-bis-epoxid oder Bis-glycidylether.

Die Reaktionsbedingungen für das Verfahren f) sind gleich wie die oben unter Verfahren d) beschriebenen Reaktionsbedingungen.

Die Ausgangsmaterialien für Verfahren f) sind bekannt oder können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden, beispielsweise durch ein Verfahren wie oben beschrieben.

Die Zwischenprodukte und Endprodukte der erfindungsgemässen Verfahren werden gewünschtenfalls gereinigt, beispielsweise durch Dialyse gegenüber Wasser oder Pufferlösungen, durch chromatographische Methoden, vorzugsweise Gelchromatographie, Hochdruck-Flüssigchromatographie, Affinitätschromatographie oder Ionenaustauscherchromatographie, durch Ultra-filtration oder durch Ultrazentrifugation.

Die Erfindung betrifft auch diejenigen Ausführungsformen des Verfahrens, bei denen man von einer auf irgendeiner Stufe als Zwischenprodukt erhältlichen Verbindung ausgeht und die fehlenden Schritte durchführt oder man das Verfahren auf irgendeiner Stufe abbricht oder man eine nach der erfindungsgemässen Verfahren erhältliche Verbindung unter den Verfahrensbedingungen erzeugt und in situ weiterverarbeitet.

Die Erfindung betrifft auch neue Zwischenprodukte und Verfahren zu ihrer Herstellung. Die Ausgangsmaterialien und die Reaktionsbedingungen werden vorzugsweise so gewählt, dass jene in der Beschreibung als bevorzugt bezeichneten Verbindungen erhalten werden.

Die Konjugate der Erfindung können für die Behandlung von viralen Infektionen und Tumoren in der Form von pharmazeutischen Präparaten verwendet werden, welche eine wirksame Menge des Konjugats zusammen mit einer signifikanten Menge eines anorganischen oder organischen, festen oder flüssigen, pharmazeutisch verwendbaren Trägerstoffes enthalten.

Bevorzugt sind pharmazeutische Präparate zur parenteralen, beispielsweise intramuskulären, subkutanen oder intravenösen Verabreichung am Menschen. Solche Präparate sind isotonische wässrige Lösungen oder Suspension enthaltend die aktiven Konjugate zusammen mit einem Trägermaterial und, wenn erwünscht, Hilfsmittel, beispielsweise Stabilisatoren, Emulgiermittel, lösungsvermittelnde Stoffe, Salze für die Regulierung des pH und des osmotischen Druckes, Konservierungsmittel und/oder Netzmittel. Die pharmazeutischen Präparationen können nach an sich bekannten Methoden hergestellt werden, beispielsweise in einem Verfahren, worin die aktiven Konjugate und die pharmazeutisch verwendbaren Träger und Hilfsstoffe gemischt, gewünschtenfalls lyophilisiert und vor Verwendung gelöst werden.

Die Dosierung der pharmazeutischen Präparate enthaltend die aktiven Konjugate hängt von der zu behandelnden Krankheit, dem Körpergewicht, Alter und individuellen Zustand des Patienten gemäss Einschätzung des behandelnden Arztes und der Applikationsweise ab. Im Vergleich zur Dosis des entsprechenden freien Cytokins werden zwischen zwei- und ungefähr hundertfach geringere Mengen an gleichwertiger biologischer Aktivität eingesetzt. Beispielsweise wird ein Konjugat enthaltend Interferon alpha ein bis drei täglichen Dosisseinheiten von  $10^4$  bis  $10^6$  IE (Internationale Einheiten der Interferon-Aktivität), vorzugsweise  $10^4$  bis  $10^5$  IE, verabreicht. Das Konjugat kann auch höher dosiert werden, beispielsweise derart, dass gleichviel biologische Aktivität wie beim freien Cytokin üblich eingesetzt wird. Dadurch wird bei einem höheren Prozentsatz der behandelten Patienten der gewünschte therapeutische Effekt des Cytokins erzielt.

Die folgenden Beispiele dienen zur Illustration der Erfindung, schränken deren Umfang jedoch in keiner Weise ein.

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutungen:

IE Internationale Einheiten der IFN-Aktivität

IFN Interferon

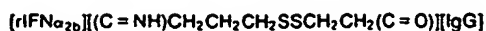
Ig Immunglobulin

IgG Immunglobulin G

PBS phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

rIFN rekombinantes Interferon

#### Beispiel 1:



1 mg polyklonaler Human-Antikörper IgG (Lyophilisat, Intraglobin F®, Biotest) wird in einem Eppendorf-Tübchen in 500 µl PBS, pH 7,2, gelöst. Zu der in einem Whirlmix geschüttelten IgG-Lösung werden 12 µl 1,6 mM 3-(2-Pyridylthio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimid-ester und 12 µl Ethanol zugetropft und die Mischung 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird über Nacht gegen PBS (3x Pufferwechsel) bei 4 °C dialysiert.

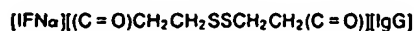
10 µg rekombinantes Human-Interferon  $\alpha_{2b}$  wird in einem Eppendorf-Tübchen in 500 µl PBS, pH 7,2, gelöst. 2-Iminoethanol wird bei 0 °C in 1 M Triethanolaminhydrochlorid, pH 8,0, gelöst. 5 µl dieser Iminoethanol-Lösung werden zur IFN-Lösung gegeben, und die Mischung 90 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird viermal je 1 Std. bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Die IFN-Lösung wird mit der obigen IgG-Lösung gemischt, bei Raumtemperatur 2 Std. geschüttelt und über Nacht bei 4 °C gehalten.

Das Konjugat wird von freiem IFN durch Ultrafiltration mittels eines Filters (durchschnittliche Ausschlussgrenze 50 000 Dalton) bei 4 °C abgetrennt. Die beiden Fraktionen werden im CPE-Inhibitionsassay (Cytopathic Effect, siehe Ho und Enders, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45, 385-389 (1959)) auf IFN-Aktivität getestet. Aktives Konjugat findet sich im Überstand.

Zur Kontrolle wird die gesamte Reaktionssequenz mit radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -IFN wiederholt. Radioaktives Konjugat wird in den Fraktionen 1 bis 10 gefunden, radioaktives IFN in den Fraktionen 12 bis 25.

Die gleiche Reaktion wird auch mit rekombinantem Human-Interferon  $\alpha/\beta$ -D-Hybrid (Ciba-Geigy AG, EP 205 404) und mit natürlichem Human-Interferon  $\alpha$  (DRK Blutspendedienst Springe) anstelle von  $\text{IFN}\alpha_{2b}$  durchgeführt.

#### 25 Beispiel 2:



2 mg polyklonaler Human-Antikörper IG (Lyophilisat, Intraglobin F®, Biotest) und 100 µg ( $10^7$  IE) natürliches Human-Interferon  $\alpha$  (DRK Blutspendedienst Springe) werden in je 1 ml PBS, pH 7,2, gelöst. Zu beiden Lösungen werden 18 µl 20 mM 3-(2-Pyridylthio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester und 82 µl PBS zugegeben, die Mischungen 30 Min. bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und über Nacht bei 4 °C gegen je 500 ml PBS dialysiert. Die IFN-Lösung wird mit 0,1% Albumin stabilisiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die IgG-Lösung wird mit 156 µl 0,1 M Natriumacetat (pH 4,5) auf ca. pH 6 gestellt, mit 3,8 mg Dithiothreitol versetzt und 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, dann wieder über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Die IFN-Lösung und die thiolierte IgG-Lösung werden gemischt, 2 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt und über Nacht bei 4 °C gehalten. Anschliessend wird das Konjugat wie in Beispiel 1 beschrieben abgetrennt.

#### Beispiel 3:

#### Verweilzeit des IFN-IgG-Konjugats in Mausserum

Je 0,4 ml einer Lösung des Konjugats von Beispiel 1 enthaltend  $3 \times 10^4$  IE werden drei Mäusen intramuskulär injiziert. Serum-Proben werden nach wenigen Minuten, 4, 8, 24, 48, 56 und 80 Stunden im CPE-Inhibitionsassay auf IFN-Aktivität untersucht. Dabei werden folgende Aktivitäten ( $\log_{10}$  IE pro ml) gemessen:

# EP 0 305 967 A2

	0 Std.	4 Std.	8 Std.	24 Std.	48 Std.	56 Std.	80 Std.
Maus 1	0,5	2,3	2,0	2,1	2,0	2,2	2,0
Maus 2	(2,0)	2,2	2,2	2,2	2,0	2,2	2,2
Maus 3	1,5	2,1	2,2	2,0	2,0	2,2	2,2
Mittelwert	1,2	2,2	2,1	2,1	2,0	2,2	2,1

Vergleichsweise fällt die IFN-Aktivität von intramuskulär injiziertem IFN $\alpha_{2b}$  allein ( $3 \times 10^4$  IE) wesentlich stärker ab:

	0 Std.	4 Std.	24 Std.	32 Std.	56 Std.	72 Std.	80 Std.
Maus 1	0,7	2,3	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5
Maus 2	0,5	2,2	1,6	1,1	0,8	0,5	-
Maus 3	0,5	0,8	2,1	0,9	0,5	0,5	0,5
Maus 4	-	1,7	2,1	1,2	-	0,7	0,5
Mittelwert	0,6	2,0	1,9	1,0	0,5	0,5	0,5

Praktisch die gleichen Werte wie mit IFN $\alpha_{2b}$  allein werden gefunden, wenn Gemische von IFN $\alpha_{2b}$  und Intraglobin F (Human-IgG) injiziert werden.

## Beispiel 4:

### Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von [Cytokin]((C=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(C=O))[Ig]

Jeweils 2,5 mg Cytokin und Immunglobulin werden in 0,5 ml PBS pH 7,2 gelöst und mit je 100  $\mu$ l einer frisch zubereiteten 3-(2-Pyridyldithio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester-Lösung (4 mM) 30 Min. bei 25 °C inkubiert. Eine PD-10 Gelfiltrations-Säule wird mit 20 ml einer Dithiothreitol-Lösung äquilibriert. Danach wird die If-Lösung auf die Säule aufgegeben und mit 6 ml Acetatpuffer pH 4,5 eluiert. Es werden Fraktionen à 500  $\mu$ l aufgefangen und die Extinktion bei 280 nm vermessen. Proteinhaltige Fraktionen werden vereinigt, auf eine neue, mit PBS äquilibrierte PD-10 Gelfiltrations-Säule aufgetragen und mit Phosphatpuffer eluiert. Die Cytokin-Lösung wird ebenfalls mit Phosphatpuffer über eine PD-10-Säule gefiltriert, danach mit der thiolierten Ig-Lösung vermischt und 2 Std. bei Raumtemperatur und 20 Std. bei 4 °C inkubiert. Das Reaktionsprodukt wird mit Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert.

## Beispiel 5:

### Pharmazeutische Zusammensetzung

Lösungen enthaltend  $10^6$  IE des IFN $\alpha$ -Konjugats von Beispiel 1 werden mit Human-Albumin bis zu einer Endkonzentration von 1 % versetzt, bei 4 °C gegen PBS dialysiert, durch einen bakteriologischen Filter sterilitätstestiert und das Filtrat unter aseptischen Bedingungen in 10 Ampullen von 1 ml abgefüllt. Die Ampullen werden vorzugsweise in der Kälte, beispielsweise bei -18 °C, aufbewahrt.

# Ansprüche

1. Konjugate von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin.
2. Konjugate gemäss Anspruch 1 der Formel

Ck-Z-Ig (I),

worin Ck den Rest eines natürlichen humanen oder eines rekombinanten Cytokins, Ig den Rest eines menschlichen Immunglobulins und Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen organischen Brückenbildner darstellen und worin Ck, Ig und/oder Z auch mehrfach vorkommen können.

3. Konjugate gemäss Anspruch 2 der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons, Interleukins, einer verwandten Verbindung oder eines Fragments, das die biologische Aktivität beibehält, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins, Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen, zwei-, drei- oder vierwertigen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gewünschtenfalls substituiert ist und/oder worin gewünschtenfalls eines oder mehrere Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel- und/oder gegebenenfalls substituierte Stickstoffatome ersetzt sind, und worin Ck, Ig und/oder Z auch mehrfach vorkommen können.

4. Konjugate gemäss Anspruch 2 oder 3 der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons oder einer verwandten Verbindung, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins und Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen zweiwertigen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gewünschtenfalls durch Oxo oder Imino substituiert ist und/oder worin eines oder mehrere Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel- und/oder Stickstoffatome ersetzt sind.

5. Konjugate gemäss einem der Ansprüche 2 bis 4 der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons alpha oder gamma, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G oder M und Z eine kovalente Bindung, unsubstituiertes oder durch Oxo und/oder Imino substituiertes Niederalkylen und Kombinationen dieses Restes mit Oxy, Thio, Amino, Phenylen und/oder Azacycloalkylen darstellen.

6. Konjugate gemäss einem der Ansprüche 2 bis 5 der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons alpha, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G und Z einen kovalent gebundenen, durch Oxo und/oder Imino substituierten Niederalkylen-dithio-niederalkylen-Rest darstellen.

7. Konjugate gemäss einem der Ansprüche 2 bis 6 der Formel I, worin Ck den Rest von rekombinantem IFN $\alpha_{2b}$ , Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G und Z Carbonimidoyl-propylen-dithio-ethylen-carbonyl darstellen.

8. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Cytokin mit menschlichem Immunglobulin und gewünschtenfalls einem Brückenbildner umgesetzt wird.

9. Verfahren gemäss Anspruch 8 zur Herstellung von Konjugaten der Formel

Ck-Z-Ig (I),

dadurch gekennzeichnet, dass 2 oder 3 reaktive Teile des Konjugats der Formel I so miteinander zur Reaktion gebracht werden, dass ein Konjugat mit kovalenten Bindungen gebildet wird, und das Konjugat isoliert wird.

10. Verfahren gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass

a) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Amidbindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Aminogruppe mit dem komplementären Teil enthaltend eine Carbonsäure-Gruppe oder mit einem reaktiven Derivat davon kondensiert wird, oder

b) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Disulfidbindung verknüpft sind, zwei komplementäre Teile, die beide eine Mercaptogruppe enthalten, mit einem milden Oxidationsreagens behandelt werden, oder

c) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Disulfidbindung verknüpft sind, ein reaktives, substituierbares funktionelles Derivat der Mercaptogruppe eines Teils mit dem komplementären Teil enthaltend eine Mercaptogruppe substituiert wird, oder



- d) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Schwefel-Bindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Mercapto-Gruppe an den komplementären Teil enthaltend Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung oder enthaltend eine Epoxid-Funktion addiert oder eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung durch die Mercapto-Gruppe substituiert wird, oder
- 5 e) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einzel- oder Doppelbindung verknüpft sind, eine Aldehyd-Gruppe eines Teiles mit dem komplementären Teil enthaltend eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe kondensiert wird, und gewünschtenfalls die erhältliche Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung zu einer Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung mit einem Reduktionsmittel reduziert wird, oder
- 10 f) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe an den komplementären Teil enthaltend eine Epoxid-Funktion addiert oder eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung durch die Amino- oder Hydrazino-Gruppe substituiert wird.
11. Pharmazeutische Präparate enthaltend Konjugate von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin.
- 15 12. Verwendung von Konjugaten von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten.

Patentansprüche für die folgenden Vertragsstaaten: ES, GR

- 20 1. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin, dadurch gekennzeichnet, dass ein Cytokin mit menschlichem Immunglobulin und gewünschtenfalls einem Brückenbildner umgesetzt wird.
2. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Herstellung von Konjugaten der Formel
- 25 Ck-Z-Ig (I),
- worin Ck den Rest eines natürlichen humanen oder eines rekombinanten Cytokins, Ig den Rest eines menschlichen Immunglobulins und Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen organischen Brückenbildner darstellen und worin Ck, Ig und/oder Z auch mehrfach vorkommen können, dadurch
- 30 gekennzeichnet, dass 2 oder 3 reaktive Teile des Konjugats der Formel I so miteinander zur Reaktion gebracht werden, dass ein Konjugat mit kovalenten Bindungen gebildet wird, und das Konjugat isoliert wird.
3. Verfahren gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass
- a) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Amidbindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Aminogruppe mit dem komplementären Teil enthaltend eine Carbonsäure-
- 35 Gruppe oder mit einem reaktiven Derivat davon kondensiert wird, oder
- b) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Disulfidbindung verknüpft sind, zwei komplementäre Teile, die beide eine Mercaptogruppe enthalten, mit einem milden Oxidationsreagens behandelt werden, oder
- c) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Disulfidbindung
- 40 verknüpft sind, ein reaktives, substituierbares funktionelles Derivat der Mercaptogruppe eines Teils mit dem komplementären Teil enthaltend eine Mercaptogruppe substituiert wird, oder
- d) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Schwefel-Bindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Mercapto-Gruppe an den komplementären Teil enthaltend eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung oder enthaltend eine Epoxid-Funktion addiert oder eine
- 45 Kohlenstoff-Halogen-Bindung durch die Mercapto-Gruppe substituiert wird, oder
- e) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einzel- oder Doppelbindung verknüpft sind, eine Aldehyd-Gruppe eines Teiles mit dem komplementären Teil enthaltend eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe kondensiert wird, und gewünschtenfalls die erhältliche Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung zu einer Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung mit einem
- 50 Reduktionsmittel reduziert wird, oder
- f) zur Herstellung eines Konjugates der Formel I, worin die Teile durch eine Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindung verknüpft sind, ein Teil enthaltend eine Amino- oder eine Hydrazino-Gruppe an den komplementären Teil enthaltend eine Epoxid-Funktion addiert oder eine Kohlenstoff-Halogen-Bindung durch die Amino- oder Hydrazino-Gruppe substituiert wird.
- 55 4. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3 zur Herstellung von Konjugaten der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons, Interleukins, einer verwandten Verbindung oder eines Fragments das die biologische Aktivität beibehält, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins, Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen zwei-, drei- oder vierwertigen

Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gewünschtenfalls substituiert ist und/oder worin gewünschtenfalls eines oder mehrere Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel- und/oder gegebenenfalls substituierte Stickstoffatome ersetzt sind, und worin Ck, Ig und/oder Z auch mehrfach vorkommen können.

5 5. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3 zur Herstellung von Konjugaten der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons oder einer verwandten Verbindung, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins und Z eine kovalente Bindung oder einen kovalent gebundenen zweiwertigen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gewünschtenfalls durch Oxo oder Imino substituiert ist und/oder worin eines oder mehrere Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel- und/oder Stickstoffatome ersetzt sind.

10 6. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3 zur Herstellung von Konjugaten der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons alpha oder gamma, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G oder M und Z eine kovalente Bindung, unsubstituiertes oder durch Oxo und/oder Imino substituiertes Niederalkylen und Kombinationen dieses Restes mit Oxy, Thio, Amino, Phenylen und/oder Azacycloalkylen darstellen.

15 7. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3 zur Herstellung von Konjugaten der Formel I, worin Ck den Rest eines natürlichen oder rekombinanten humanen Interferons alpha, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G und Z einen kovalent gebundenen, durch Oxo und/oder Imino substituierten Niederalkylen-dithio-niederalkylen-Rest darstellen.

20 8. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3 zur Herstellung von Konjugaten der Formel I, worin Ck den Rest von rekombinantem IFN<sub>α2b</sub>, Ig den Rest eines natürlichen humanen Immunglobulins G und Z Carbonimidoyl-propylen-dithio-ethylen-carbonyl darstellen.

9. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten enthaltend Konjugate von Cytokinen mit menschlichem Immunglobulin, dadurch gekennzeichnet, dass man die Konjugate mit einem pharmazeutischen Träger mischt.

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 11 4130

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	GB-A-1 564 666 (NG, MUN HON) * Insgesamt * ---	1-12	A 61 K 45/02 A 61 K 39/395 A 61 K 47/00 A 61 K 37/02 C 07 K 15/14 C 07 K 15/26
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 103, Nr. 3, 22. Juli 1985, Seite 449, Zusammenfassung Nr. 21010p, Columbus, Ohio, US; S.S. ALKAN et al.: "Antiviral and antiproliferative effects of interferons delivered via monoclonal antibodies", & J. INTERFERON RES. 1984, 4(3), 355-63 * Zusammenfassung * ---	1-12	
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 78, Nr. 9, 1984, Seite 7803, Zusammenfassung Nr. 69267, Biological Abstracts Inc., Philadelphia, PA, US; G.R. FLANNERY et al.: "Immunomodulation: Natural killer cells activated by interferon-conjugated monoclonal antibody against human osteosarcoma", & EUR J CANCER CLIN ONCOL 20(6): 841-848, 1984 * Zusammenfassung * -----	1-12	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			A 61 K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 09-11-1989	Prüfer SKELLY J.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 150 (01.81) (P002)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**